

1. Title of the Invention

METHOD OF PRODUCING ISOFLAVONE DERIVATIVE

2. Claim

- 5 A method of producing an isoflavone derivative, comprising bringing an extract of soybeans, as it is or after evaporating a solvent, into contact with a synthetic adsorption resin so that an isoflavone derivative is adsorbed to the resin, and then
10 eluting the isoflavone derivative from the synthetic resin using an organic solvent or a mixed solvent of an organic solvent and water.

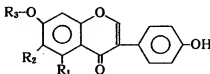
3. Detailed Description of the Invention

[Industrial Application]

- 15 The present invention relates to a simple and inexpensive method of producing an isoflavone derivative.

[Prior Art and Problems]

- Soybeans, which are seeds of *Glycine max* (Leguminosae),
20 have been cultivated since ancient times as a valuable source of vegetable protein, and are used as a raw material for various food products. In addition to protein, sugar, and vitamins, soybeans contain daidzin, glycitin, genistin, daidzein, genistein, and other isoflavone derivatives represented by the following
25 formula:



	R ₁	R ₂	R ₃
Daidzin	H	H	Glucose
Glycitin	H	OCH ₃	Glucose
Genistin	OH	H	Glucose
Daidzein	H	H	H
Genistein	OH	H	H

Such isoflavone derivatives are known to have many

pharmacological actions, such as the papaverine-like antispasmodic action of daidzein in mouse-isolated small intestine (Journal of the Pharmaceutical Society of Japan, vol. 97, 103 (1977)). Accordingly, when isoflavone derivatives are
5 provided as drugs in the future, how to obtain large amounts of isoflavone derivatives at low cost will be an important factor.

In the past, isoflavone derivatives have been obtained by a method in which an extract obtained from soybeans using an organic solvent or an aqueous organic solvent is purified by
10 column chromatography using alumina, silica gel, or the like as an adsorbent.

When such a method is applied to industrial large-scale purification, however, the load on the adsorbent increases remarkably, and the expanded scale complicates the operation.
15 Because of these disadvantages, only a small amount of isoflavone derivatives can be obtained, and such isoflavone derivatives are thus expensive. Additionally, industrial purification of isoflavone derivatives is nearly nonexistent.

20 [Means for Solving the Problem]

As a result of extensive research on a method for obtaining large amounts of isoflavone derivatives at low cost, the present inventors found that an extract of soybeans can, as it is or after evaporating a solvent, be brought into contact with a
25 synthetic adsorption resin so that an isoflavone derivative is adsorbed to the resin, after which the isoflavone derivative is eluted from the synthetic resin using an organic solvent or a mixed solvent of an organic solvent and water, thereby obtaining large amounts of isoflavone derivatives at low cost. The present
30 invention was thus accomplished.

The present invention is described in detail below.

When an extract is obtained from soybeans, the soybeans used for extraction may be seeds of *Glycine max* Merrill. Examples of extraction solvents include water, an organic solvent, and a
35 mixed solvent of water and an organic solvent. The extraction may

be carried out at a temperature in the range from room temperature to the boiling point of the extraction solvent.

At present, about 180,000 tons of soybeans are consumed per year in the production of miso in Japan, with most of the cooking liquid thereof discarded as waste liquid. The soybean extract as used in the present invention also includes such waste liquid. Therefore, using the extract obtained from soybeans during miso production, which has been in disuse, isoflavone derivatives can be obtained at much lower cost.

Next, the extract is, as it is or after evaporating the solvent, brought into contact with a synthetic adsorption resin so that an isoflavone derivative is adsorbed to the resin. When the extract has a different properties in acidity or basicity, in order to enhance the rate of adsorption of the isoflavone derivative to the synthetic adsorption resin, a suitable acidifying agent or alkalifying agent is preferably added, as needed, so as to maintain the extract at a pH of about 3.5 to 5.0. In such cases, acetic acid, hydrochloric acid, etc. may be used as an acidifying agent, and sodium hydrogen carbonate, sodium hydrate, etc. as an alkalifying agent.

When an aqueous solvent is used as the solvent for extraction, in order to enhance the rate of adsorption of the isoflavone derivative to the synthetic adsorption resin, the aqueous solvent is preferably evaporated from the extract.

Specific examples of synthetic adsorption resins include "Diaion HP resin" (produced by Mitsubishi Kasei Corp.), "Amberlite XAD resin" (produced by Rohm and Haas Co. Ltd.), "Duolite S resin" (produced by Diamond Shamrock), and the like.

Either the batch or column method may be used to bring the extract into contact with the synthetic adsorption resin. When the batch method is used, the contact operation can be performed in a general manner. For example, the synthetic adsorption resin is put in a suitable container and suitably stirred. When the column method is used, the contact operation can be achieved by an ordinary procedure, and the dissolution rate can be suitably

selected depending on various conditions such as the size of the column, the elution solvent to be used, etc. Since both the batch and column methods are based on physical adsorption, temperatures around room temperature are preferred.

5 Subsequently, the isoflavone derivative adsorbed to the synthetic adsorption resin is eluted using an organic solvent or a mixed solvent of an organic solvent and water. In this case, either the batch or column method may be used. As the solvent for elution, an organic solvent or a mixed solvent of water and an
10 organic solvent may be used. The type, concentration, and amount of elution solvent are suitably selected depending on various conditions such as the procedure (column or batch method) selected, the type and amount of synthetic adsorption resin used, etc.

15 Specific examples of organic solvents include methanol, ethanol, isopropanol, acetone, and the like. Alcohols are preferred, and ethanol is more preferred.

 When an eluate obtained by the batch or column method contains several components, the eluate can be purified and
20 isolated by ordinarily used separation and purification techniques (e.g., countercurrent distribution, recrystallization, column chromatography, etc.).

 The synthetic adsorption resin used in the method of producing an isoflavone derivative of the present invention is
25 very economical because it can be repeatedly used after being recycled by washing with suitable organic solvents (e.g., alcohol- or acetone-based organic solvents, etc.) or alkaline agents (e.g., sodium hydrate, potassium hydroxide, etc.).

30 [Examples]

 Hereinafter, the present invention is described in more detail with reference to examples. However, the invention is not limited thereto.

Example 1

35 A soybean stock (3 L) obtained during miso production was

adjusted to a pH of 4.0 with acetic acid, and then filtered through a cotton plug, thereby obtaining a filtrate. The filtrate was added to a resin tower filled with 500 mL of styrene-divinylbenzene polymer resin (Diaion HP-20; produced by Mitsubishi Kasei Corp.), which had been activated by washing with 600 mL of methanol and 600 mL of water, passing through the resin tower at 50 mL/min. Subsequently, 600 mL of water and a 20% methanol aqueous solution were further added for washing. After washing, 1.8 L of ethanol was allowed to pass through the resin tower at a dissolution rate of 30 mL/mh, thus obtaining a solution containing daidzin, glycitin, genistin, daidzein, and genistein.

Example 2

15 An 80% ethanol solution was added to 20 g of commercially available defatted soybean, and the mixture was refluxed on a water bath for 4 hours. After cooling, the mixture was filtered through a filter paper to obtain an extract. Water (150 mL) was added to 50 mL of the extract, and the pH was adjusted to 4.0 with acetic acid. The resultant solution was added to a resin tower filled with 20 mL of styrene-divinylbenzene polymer resin (Diaion HP-20; produced by Mitsubishi Kasei Corp.), which had been activated by washing with 100 mL of methanol and 100 mL of water, passing through the resin tower at 1 mL/min. Subsequently, 20 100 mL of ethanol was allowed to pass through the tower at a dissolution rate of 5 mL/min, thus obtaining a solution containing daidzin, glycitin, genistin, daidzein, and genistein.

Example 3

30 A soybean stock (500 mL) was adjusted to a pH of 4.0 with acetic acid, and 200 mL of styrene-divinylbenzene polymer resin (Diaion HP-20; produced by Mitsubishi Kasei Corp.), which had been activated with 400 mL of methanol and 400 mL of water, was added thereto. The mixture was allowed to stand at room temperature for 2 hours, while stirring occasionally. The 35

resultant solution was filtered through a Kiriyaama funnel, and the residue was transferred to a column. After adding 400 mL of water for washing, 2 L of a 70% methanol aqueous solution was allowed to pass through the column at a dissolution rate of 50
5 mL/min, thus obtaining a brown solution containing puerarin and daidzin. Subsequently, 2.5 L of methanol was added, thus obtaining a brown solution containing daidzein.

⑪ 公開特許公報(A) 昭62-126186

⑫ Int. Cl.⁴

識別記号

庁内整理番号

⑬ 公開 昭和62年(1987)6月8日

C 07 D 311/56

6640-4C

C 07 H 17/07

6742-4C

審査請求 未請求 発明の数 1 (全3頁)

⑭ 発明の名称 イソフラボン誘導体の製造方法

⑮ 特 願 昭60-266125

⑯ 出 願 昭60(1985)11月28日

⑰ 発 明 者 小 菅 卓 夫 静岡市小鹿1-33-13

⑱ 発 明 者 石 田 均 司 静岡市瀬名200-16 県職員住宅205号

⑲ 発 明 者 北 田 善 三 天理市三味田町84-3

⑳ 出 願 人 株式会社津村順天堂 東京都中央区日本橋3丁目4番10号

㉑ 出 願 人 小 菅 卓 夫 静岡市小鹿1-33-13

昭和 62 年 6 月 8 日

1. 発明の名称

イソフラボン誘導体の製造方法

2. 特許請求の範囲

大豆の抽出液をそのまましくは溶媒を留去して合成吸着樹脂に接触させて、イソフラボン誘導体を吸着せしめ、次いで有機溶媒または有機溶媒と水との混合溶媒を用いて該合成樹脂から溶出させてイソフラボン誘導体を得ることを特徴とするイソフラボン誘導体の製造方法。

3. 発明の詳細な説明

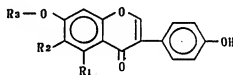
〔産業上の利用分野〕

本発明は、簡便かつ安価な、イソフラボン誘導体の製造方法に関する。

〔従来の技術および問題点〕

マメ科(Leguminosae)の植物であるダイズの種子、大豆は貴重な植物蛋白源として古くより栽培されており、種々の食品の原料となっている。

この大豆には、蛋白質、糖質、ビタミン類の他に、下記式



	R ₁	R ₂	R ₃
ダイズイン	H	H	グルコース
グリシチン	H	OCH ₃	グルコース
ゲニスチン	OH	H	グルコース
ダイゼイン	H	H	H
ゲニステイン	OH	H	H

で表されるダイズイン、グリシチン、ゲニスチン、ダイゼイン、ゲニステイン等のイソフラボン誘導体が含まれており、ダイゼインのマウス抽出小腸におけるパバペリン様抗腫瘍作用[薬学雑誌, 97, 103(1977)]をはじめとして多くの薬理作用が知られている。従って、今後これらのイ

ソフラボン誘導体を医薬品として提供する場合、いかに安価に、かつ大量にイソフラボン誘導体を得るかが重要な因子となる。

従来、イソフラボン誘導体を得るには、大豆の有機溶媒または、含水有機溶媒による抽出液をアルミナ、シリカゲル等を吸着剤とするカラムクロマトグラフィーで精製する方法がとられていた。

しかし、これらの方法を工業的大量精製に適用する場合、吸着剤への負荷量が顕著に多くなることや、規模拡大のために操作が煩雑になる等の不都合が生じるため、得られるイソフラボン誘導体は少量でしかも高価なものになる。また、イソフラボン誘導体の工業的な精製はほとんど行なわれていない。

【問題点を解決するための手段】

本発明者等は、安価に、かつ大量にイソフラボン誘導体を得るための方法について鋭意検討した結果、大豆の抽出液をそのまましくは溶媒を留去して合成吸着樹脂に接触させて、イソフラボン誘導体を吸着せしめ、次いで有機溶媒または有機

誘導体を吸着せしめる。抽出液に酸性度、塩基性度の違いがある場合は、イソフラボン誘導体の合成吸着樹脂への吸着率を向上させるために適宜、適当な酸性化剤やアルカリ性化剤を添加して、 $\text{pH} 3.5 \sim \text{pH} 5.0$ 程度の条件に保つことが望ましく、この際の酸性化剤としては酢酸、塩酸等が挙げられ、アルカリ性化剤としては炭酸水素ナトリウム、水酸化ナトリウム等が挙げられる。

また、前記抽出時に抽出溶媒として水性溶媒を使用している場合は、イソフラボン誘導体の合成吸着樹脂への吸着率を向上させるために、抽出液から使用した水性溶媒を留去しておくことが望ましい。

合成吸着樹脂の具体例としては、「ダイアイオン H P 樹脂」(三菱化成工業株式会社製)、「アンバーライト X A D 樹脂」(ロームアンドハース株式会社製)、「デュオライト S 樹脂」(ダイマモンドシヤムロック社製)等が挙げられる。

前記抽出液と合成吸着樹脂との接触は、パッチ法またはカラム法のいずれの方法を使用してもよ

溶媒と水との混合溶媒を用いて合成吸着樹脂から溶出させることにより安価に、かつ大量にイソフラボン誘導体を得られることを見出し、本発明を完成させた。

以下に本発明を詳細に説明する。

大豆の抽出液を得る際に、抽出に用いられる大豆は、*Glycine max* Merrill の種子を用いることができる。抽出溶媒は水、有機溶媒または水と有機溶媒との混合溶媒が挙げられ、室温から抽出溶媒の沸点までの温度範囲内で抽出する。

また、現在、味噌の製造には、全国で年間約 18 万トンの大豆が消費されており、その水蒸液のほとんどは廃液として捨てられているが、本発明で言うところの大豆の抽出液は、このような廃液をも包含する。従って、従来ほとんど利用されていなかった味噌製造時の大豆の抽出液を利用すれば、より安価にイソフラボン誘導体を得ることができる。

次に、前記抽出液をそのまましくは溶媒を留去して合成吸着樹脂に接触させて、イソフラボン

い。パッチ法の場合は、適当な容器に合成吸着樹脂を入れ、適宜攪拌する等、一般的な手法により行うことができる。カラム法の場合は、通常行われる手法により達成でき、溶出速度は、カラムの大きさ、使用する溶出溶媒等の種々の条件を考慮して、適宜選択することができる。上記、パッチ法およびカラム法ともに物理吸着であるため、温度としては室温程度が望ましい。

次に、合成吸着樹脂に吸着したイソフラボン誘導体を有機溶媒または有機溶媒と水との混合溶媒を用いて溶出させる。この場合、パッチ法、カラム法のいずれを使用しても良く、溶出に用いる溶媒としては、有機溶媒または有機溶媒と水との混合溶媒を用い得る。溶出溶媒の種類、濃度、量はカラム法で行うかパッチ法で行うか、また、用いる合成吸着樹脂の種類および量等の種々の条件を考慮して適宜選択する。

有機溶媒の具体例としては、メタノール、エタノール、イソプロパノール、アセトン等が挙げられるが、好ましくはアルコール類、さらに好まし

くはエタノール等が挙げられる。

バッチ法により得られた溶出液、またはカラム法により得られた溶出液に複数の成分が含まれている場合には、通常用いられる分離精製の手法(例えば、向流分配、再結晶、カラムクロマトグラフイー等)により、精製し、単離することができる。

本発明のイソフラボン誘導体の製造方法で使用した合成吸着樹脂は、適当な有機溶媒(例えば、アルコール系、アセトン系有機溶媒等)または、アルカリ剤(例えば、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム等)により洗浄再生することにより、繰り返し使用が可能であり、非常に経済的である。

【実施例】

次に実施例を示して本発明を更に詳しく説明するが、本発明はこれにより何ら制限されるものではない。

実施例 1

味噌製造時に得られる大豆煮汁3㍓を酢酸でpH4.0に調整した後、綿布で濾過し、濾液を得た。次に、600mlのメタノールと600mlの水

ノールを溶出速度5ml/minで通過させ、ダイズイン、グリシチン、ゲニスチン、ダイゼイン、ゲニステインを含有する溶液を得た。

実施例 2

大豆煮汁500mlを酢酸でpH4.0に調整した溶液に、400mlのメタノールと400mlの水で活性化させたスチレン-ジビニルベンゼン重合樹脂(三菱化成工業株式会社製、ダイヤイオンHP-20)200mlを添加し、時々攪拌しながら室温で2時間放置した。この溶液を順山ロートで濾過して、その残渣をカラムに移し、400mlの水を加えて洗浄を行った後、カラムに70%メタノール水溶液2㍓を溶出速度50ml/minで通過させ褐色のブエラリン、ダイズイン含有溶液を、次に、メタノール2.5㍓で褐色のダイゼイン含有溶液を得た。

特許出願人 株式会社 津村順天堂

代表者 津 村 昭



小 菅 卓 夫



で洗浄し、活性化させたスチレン-ジビニルベンゼン重合樹脂(三菱化成工業株式会社製、ダイヤイオンHP-20)500mlを充填した樹脂塔に、前記の濾液を添加し、樹脂塔内を50ml/minで通過させ、次いで600mlの水、さらに20%メタノール水溶液を加えて洗浄を行った。洗浄液、樹脂塔に1.8㍓のエタノールを溶出速度30ml/minで通過させ、ダイズイン、グリシチン、ゲニスチン、ダイゼイン、ゲニステインを含有する溶液を得た。

実施例 2

市販の脱脂大豆20gに80%エタノール水溶液を加えて、水浴上で4時間還流し、冷却後濾紙で濾過して得られた抽出液50mlに、水150mlを加え、酢酸でpH4.0に調整した。この液を、100mlのメタノールと100mlの水で洗浄活性化させたスチレン-ジビニルベンゼン重合樹脂(三菱化成工業株式会社製、ダイヤイオンHP-20)200mlを充填した樹脂塔に添加し、樹脂塔内を1ml/minで通過させ、次いで、100mlのエタ